

## FLUORESCENT PH INDICATOR

**Patent number:** JP6207112  
**Publication date:** 1994-07-26  
**Inventor:** JIEI BURUUSU PITSUTONAA; RANDARU EI HOOKU  
**Applicant:** BECTON DICKINSON CO  
**Classification:**  
 - international: C09B11/28; C09K11/06; G01N21/80; G01N31/22  
 - european: C07D311/82; C09B11/24; G01N31/22B  
**Application number:** JP19930173289 19930713  
**Priority number(s):** US19920912426 19920713

Also published as:

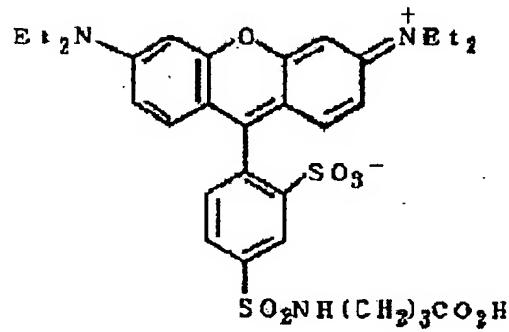
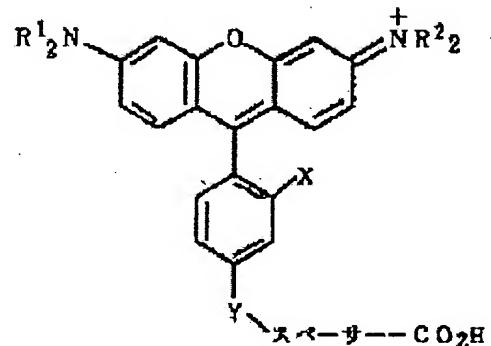
EP0582836 (A1)  
 US5302731 (A1)  
 EP0582836 (B1)

[Report a data error here](#)

Abstract not available for JP6207112

Abstract of corresponding document: **EP0582836**

Fluorescent pH indicator compounds which exhibit an increase in fluorescence intensity with decreasing pH. The indicators are derivatives of rhodamine and sulforhodamine type dyes and are particularly useful for measuring pH in acidic environments such as carbon dioxide production by microorganisms and pH of certain acidic intracellular compartments.



Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (JP)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-207112

(43) 公開日 平成6年(1994)7月26日

(51) Int.Cl.<sup>5</sup>  
 C 0 9 B 11/28  
 C 0 9 K 11/06  
 G 0 1 N 21/80  
 31/22

識別記号  
 C 7306-4H  
 E 7306-4H  
 Z 9159-4H  
 7906-2J  
 1 2 3  
 7132-2J

F I

技術表示箇所

審査請求 有 請求項の数10 OL (全9頁)

(21) 出願番号 特願平5-173289

(22) 出願日 平成5年(1993)7月13日

(31) 優先権主張番号 912426

(32) 優先日 1992年7月13日

(33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 591007332

ベクトン・ディッキンソン・アンド・カン  
パニーBECTON DICKINSON AND  
COMPANY  
アメリカ合衆国ニュージャージー州07417  
-1880, フランクリン・レイクス, ワン・  
ベクトン・ドライブ (番地なし)(72) 発明者 ジェイ・ブルース・ピットナー  
アメリカ合衆国ノース・カロライナ州  
27702, ダーラム, ルート 5, ボックス  
92シー

(74) 代理人 弁理士 湯浅 恒三 (外6名)

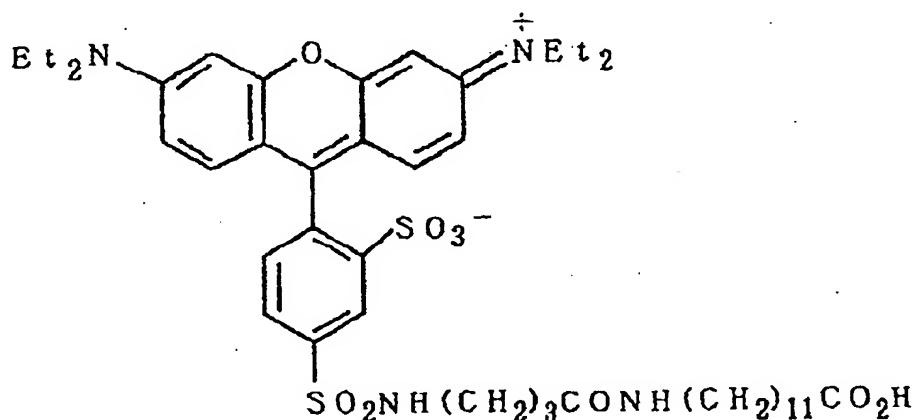
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 蛍光pH指示剤

(57) 【要約】 (修正有)

【目的】 測定される環境の酸性度が上昇するにつれて  
蛍光強度を増す蛍光pH指示剤を提供する。

\* 【構成】 たとえば右に示される構造式を有する蛍光pH指示剤、その製造方法ならびに当該蛍光pH指示剤を用いた、媒質のpH測定方法。



【効果】 本発明の蛍光pH指示剤はローダミンおよびスルホローダミン型染料の誘導体であり、pHの低下に伴って蛍光強度の増加を示すものである。本発明の蛍光

pH指示剤は、酸性環境たとえば微生物による二酸化炭素産生におけるpHの測定およびある種の細胞内室のpHの測定に有用である。

(2)

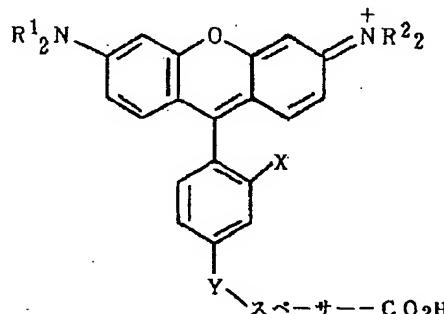
特開平6-207112

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 次式：

【化1】



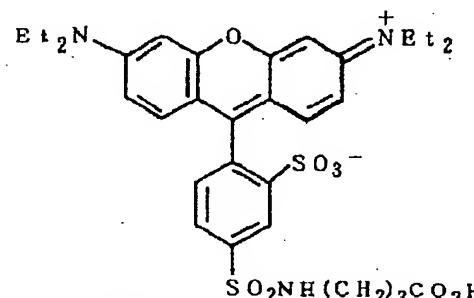
(式中、R<sup>1</sup> およびR<sup>2</sup> は水素原子、アルキル基またはシクロアルキル基であり；XはCO<sub>2</sub>H（もしくはCO<sub>2</sub><sup>-</sup>）またはSO<sub>3</sub>H（もしくはSO<sub>3</sub><sup>-</sup>）であり；Yは-CO NH-または-SO<sub>2</sub>NH-であり；そして“スペーサー”は1つ以上の-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-（n=1～12）、シクロアルキル基または-CO NH-である\*)

\*る)で表わされる構造式を有する蛍光pH指示剤。

【請求項2】 R<sup>1</sup> およびR<sup>2</sup> がアルキル基であり、XがSO<sub>3</sub>HまたはSO<sub>3</sub><sup>-</sup>であり、YがSO<sub>2</sub>NHであり、そして“スペーサー”が(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> でありその際n=3～8である請求項1記載の化合物。

【請求項3】 次式：

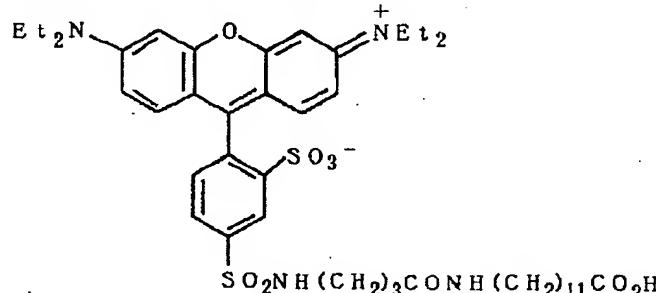
【化2】



で表わされる構造式を有する蛍光pH指示剤。

【請求項4】 次式：

【化3】



で表わされる構造式を有する蛍光pH指示剤。

【請求項5】 次の工程：

30

で表わされる構造式を有する化合物を媒質に接触させ、そして該化合物を約544nmの波長光線に暴露する請求項5記載の方法。

【請求項7】 次式：

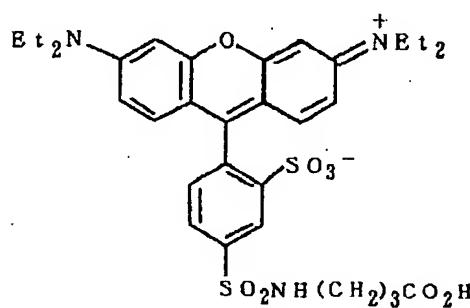
【化5】

a) 請求項1記載の蛍光pH指示剤化合物を媒質に接触させ；  
 b) 上記蛍光化合物を励起するのに適當な波長の光線に上記蛍光化合物を暴露し；  
 c) 励起した上記蛍光化合物により発せられた蛍光の強度を測定し；  
 d) 上記蛍光強度から媒質のpHを測定することからなる媒質のpHの測定方法。

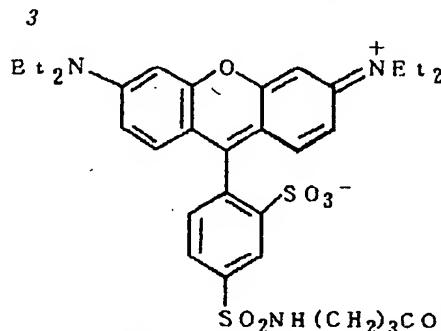
【請求項6】 次式：

【化4】

40



(3)



特開平6-207112

4

(4)

特開平6-207112

5

(Practical Fluorescence)" (1973)に開示されている。

【0004】当該技術で公知の蛍光pH指示剤の多くは、通常は蛍光強度の増加を伴ないながら、塩基性溶液中でより長波長へ吸収をシフトさせるフェノール誘導体である。これらはフェノール型官能性の脱プロトン化を当てにして蛍光強度を高めるため、これらはより長い発光波長で酸性度が上昇すると蛍光強度の低下を示す。フルオレセインおよびウムベリフェロンはこの種の指示剤の例である(ホウランド(R. P. Haugland), 1989, "モレキュラー プローブズ ハンドブック(Molecular Probes Handbook)"モレキュラー プローブズ社(Molecular Probes, Inc.)、ユージン(Eugene)、オレゴン、p. 30, 図4. 2および4. 3)。酸性度が上がると蛍光の増加を示す蛍光pH指示剤はほとんど知られておらず、たとえばエンドソームおよびリソソームのような比較的酸性環境における蛍光pH指示剤の利用を制限する。

【0005】セミナフトローダフルオール(SNARF)およびセミナフトフルオレセイン(SNAFL)pH指示剤は最近開発されたもので、約6.3~8.6の範囲におけるpH変化を測定するために有用でありそして細胞内pHの測定に適するものである。これらはベンゾ(c)キサンテン誘導体でありほとんどの他の蛍光pH指示剤と比較していくらか長波長の指示剤であり、これにより488または514nmのアルゴンレーザーにより励起しながらフローサイトメトリー法での使用に適するようになる。しかしながら、SNARF-6およびSNAFL-1を除いて、この系列の指示剤は酸性度が上がると発光強度が低下するというpHに対する通常の反応を示す。SNARF-6およびSNAFL-1は短かい波長でのみ酸性度が上がると蛍光強度の増加を示し、したがって検出をより複雑で高価な器械操作に制限する。これらのpH指示剤は米国特許第4,945,171号および"モレキュラー プローブズ ハンドブック"(ホウランド, 1989, 前掲, p 86~88および93; それぞれ化合物C-1277およびC-1255)に記載されている。対照的に、本発明の染料はpHが低下すると蛍光が増加する発光スペクトルを示すが、しかしこれはより長波長で最大発光が生じる(すなわち、等吸収点の右側に対して)。本発明の操作の仕方についてのいずれの特定理論に縛られることを望むものではないが、出願人は前述の特性により本発明の化合物がpH依存性蛍光に関してSNARF-6およびSNAFL-1とは異なる化学的メカニズムを有することを示唆していると信じている。

【0006】2',7'-ビス(2-カルボキシエチル)-5-(および-6)カルボキシフルオレセイン(BCECF)は、カルボン酸に接続する2つの一炭素 50

6

スペーサーからなるフルオレセイン部分(moiety)と連結する側鎖基を有するpH感受性染料である。ホウランド, 1989, 前掲, p. 88および93、化合物B-1151。側鎖基は本発明の化合物のものと類似しているが、しかしながらフルオレセイン部分は本発明の化合物のローダミンおよびスルホローダミン部分と構造的にかなり異なる。その上、BCECFがフルオレセインの誘導体であるので、そのpH依存性蛍光強度はフルオレセインの特性であり、すなわち酸性度の上昇に伴ない発光強度が低下する(グラバー(Graber)ら, 1986, Anal-Biochem. 156, 202-212)。BCECFは、これがBCECFそれ自体の場合に比較して、細胞に簡単に吸収されそして保持されやすいBCECFアセトキシメチル エステル/モノアセテート(BCECF-AM)として合成されうるので細胞内pHを指示するために特に有用である(コルバー(Kolber)ら, 1988, J. Immunol. Mtds. 108, 255-264)。細胞の内側でBCECF-AMは細胞エステラーゼにより加水分解されて酸の形態を形成し、これがpH依存性蛍光反応を示す。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】ローダミンおよびスルホローダミン型蛍光染料はまた当該技術で公知であり、たとえばローダミンB、スルホローダミンB、ローダミン6G、スルホローダミンGおよびテキサス レッド(Texas Red)が含まれる。これらの染料は蛍光研究に広範囲に使用されるが、しかしこれらはもしかつとしてもわずかなpH依存性蛍光強度を示すだけである。本発明の化合物はローダミンまたはスルホローダミンの誘導体であるので、これら化合物のpH感受性は親化合物がpHに依存しない蛍光を示すという事実のため期待されなかった。それゆえ本発明の化合物はスルホローダミン群の最初に知られたpH感受性染料である。フルオレセイン(フェノール性)およびローダミン(アナリン様)染料との混成物(hybrid)であるSNARF群の染料に例外があるかもしれないが、本発明のもの以外のローダミンを基礎とするpH感受性染料は知られていない。さらに、本発明の化合物は初めて発光長波長にて酸性度が上昇するにつれて蛍光強度も増加するpH指示剤を提供するものである。

【0008】

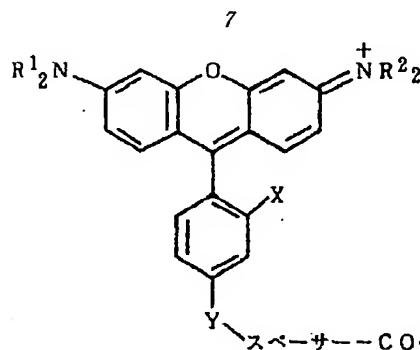
【課題を解決するための手段】本発明の蛍光pH指示剤は以下の構造式を有するローダミンまたはスルホローダミンの誘導体である:

【化8】

(5)

特開平6-207112

8



(式中、R<sup>1</sup> およびR<sup>2</sup> は水素原子、アルキル基またはシクロアルキル基であり；XはCO<sub>2</sub>H（もしくはCO<sub>2</sub><sup>-</sup>）またはSO<sub>3</sub>H（もしくはSO<sub>3</sub><sup>-</sup>）であり；Yは-CONH-または-SO<sub>2</sub>NH-であり；“スペーサー”は1つ以上の-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-（n=1～12）、シクロアルキル基または-CONH-である。）

従来技術の蛍光pH指示染料と違い、これらの化合物はより長波長の発光で水溶液中pH7～10の範囲でpHを低下させると蛍光強度の増加を示す。すなわち、これらの化合物はローダミン染料の幾つかの利点（すなわち、高収率、長い励起波長および光安定性）を有するが、しかし従来技術のローダミン型染料中に存在しない蛍光強度におけるpH依存性変化をも示す。より長い波長の特性により実施者がより安価な器械を使用して蛍光を検出することができるようになり、これまで公知の蛍光pH指示剤では満足できなかった多くの生物学的用途、たとえば細菌性CO<sub>2</sub>産生の測定において高感度を提供する。

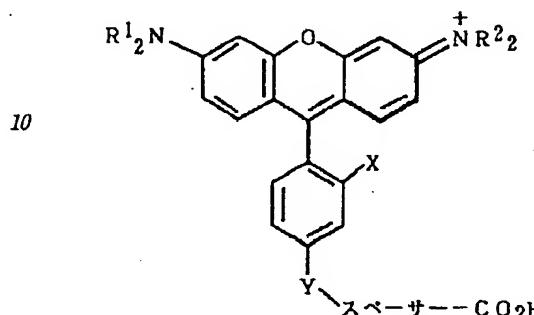
【0009】図1は化合物I(SRB-GABA)のpH依存性蛍光反応を示す。

【0010】図2は化合物II(SRB-GABA-A

DA) のpH依存性蛍光反応を示す。

【0011】本発明の蛍光pH指示剤は、“スペーサー”により染料へ連結したカルボン酸を有するローダミンまたはスルホローダミンの蛍光染料の誘導体である。これらは次の一般的構造を有する：

【化9】



(式中、R<sup>1</sup> およびR<sup>2</sup> は水素原子、アルキル基またはシクロアルキル基であり；XはCO<sub>2</sub>H（もしくはCO<sub>2</sub><sup>-</sup>）またはSO<sub>3</sub>H（もしくはSO<sub>3</sub><sup>-</sup>）であり；Yは-CONH-または-SO<sub>2</sub>NH-であり；そしてスペーサーは1つ以上の-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-（n=1～12）、シクロアルキル基または-CONH-である。) 好ましい化合物は、式中R<sup>1</sup> およびR<sup>2</sup> が水素原子、アルキル基またはシクロアルキル基であり；XがSO<sub>3</sub>H（もしくはSO<sub>3</sub><sup>-</sup>）であり；Yが-SO<sub>2</sub>NH-であり；そしてスペーサーが1つ以上の-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-（n=1～12）、シクロアルキル基または-CONH-であるスルホローダミンの誘導体である。

【0012】最も好ましい化合物は次の構造式を有する：

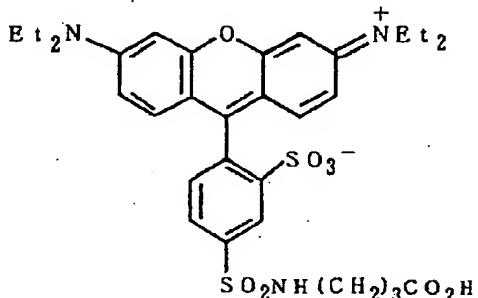
【化10】

(6)

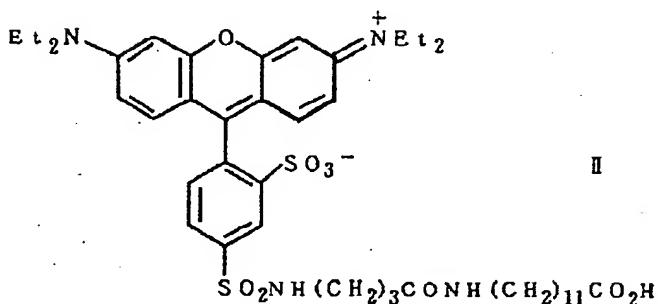
9

特開平6-207112

10



または



(式中、Etがエチル基である)。化合物IおよびIIはスルホローダミンBの誘導体である。化合物Iにおいて、Y-スペーサー-CO<sub>2</sub>H部分はスルホローダミンBのパラ位でスルホニル基と連結したγ-アミノ酸(GABA)である。化合物IIにおいて、Y-スペーサー-CO<sub>2</sub>H部分はスルホニル基と連結したGABAおよび12-アミノドデカン酸(ADA)である。

【0013】これらのpH指示剤は約pH7～約pH10のpH検出範囲を有する。最善には、これらは約544nmで励起されそして発光が約580～590nmで測定される。この励起波長により励起のためにヘリウム-ネオン(He Ne)レーザーを使用することができしかも天然蛍光のためにコスト的利点とバックグラウンドの排除を伴なう。He Neレーザーは免疫蛍光およびフローサイトメトリー用途ならびに二酸化炭素感知装置にも一般に使用され、これにより本発明のpH指示剤は特にこれらのタイプの研究に使用するのに適するものとなる。

【0014】本発明の化合物はローダミンまたはスルホローダミン酸塩化物をスペーサー部分と反応させることにより合成される。化合物Iの場合、スルホローダミンBスルホニルクロリドをGABAと反応させてpH指示剤(SRB-GABA)を形成する。化合物IIについては、SRB-GABAを次いでN-ヒドロキシサクシニミド(NHS)と反応させて活性化エステルを形成しこれをADAと結合する。同様にしてSRB-GABA-NHSとペンタグリシンとを反応させることによりペントグリシン誘導体が製造されると思われる。

【0015】本発明を説明するために本発明の特定の実

施設様を以下の実施例に記載する。これらはいずれにしても特許請求の範囲で定義される本発明の範囲を限定するものではない。本明細書および以下の実施例を研究する際、本発明の修正および変形が本発明の精神を外れることなくそして本発明技術を実習することなく当業者に思い出されるであろう。これらの修正および変形もまた本発明に含まれる。

【0016】以下の実験的実施例において、分析用TLCは、EMサイエンス社(ニュージャージー州、チエリーヒル、カタログ番号5534)からの0.25厚アルミニウム裏打ちシリカゲル板および0.2mm厚ワットマンガラス裏打ち逆相KC-18F板において行なわれた。分析用逆相HPLCは光ダイオード配列検知(200～600nm)を備えたウォーターズ8601Iポンプ装置およびブラウンリー(Brownlee)スフェリー(Spherie)-5RP-18220×4.6mmカラムを使用した。1:1～95:5のメタノール:水の直線状勾配液を30分間かけてHPLCに使用した。蛍光スペクトルをパーキン-エルマーLS-5フルオロメーターに記録した。NMRスペクトルをIBM/ブルッカーWP-200SY200MHz装置に記録し、化学シフトをテトラメチルシランとの関係で報告する。陽イオン高速原子衝撃(FAB+)質量スペクトルを、グリセロールマトリックスを用いたVGトリオ-2四重極装置を用いて得た。スルホローダミンB(SRB)はボリサイエンス社(ペンシルバニア州、ウォーリントン)から入手し、そして上記条件下でHPLC保持時間は2.0分であった。

【0017】

(7)

11

## 【実施例】

## 実施例1 SRB-GABAの合成

スルホローダミンB スルホニルクロリド(0.740 g, 1.28ミリモル)および $\gamma$ -アミノ酸(GABA, 1.32 g, 12.8ミリモル)を、0°Cに維持した水中にジメチルアミノビリジン(DMAP-アルドリッヒ, 30 mg)および30%トリエチルアミン(Et3N-フィッシャー)を混合した攪拌混液へ添加した。攪拌を0°Cにて4時間、次いで室温にて一晩続けた。溶媒を回転蒸発により除くと、その結果黒紫/ピンク色の残渣が得られた。メタノール数滴と統いてCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>で25 mlを残渣へ加えた。混合物を攪拌し、不溶性分画を減圧濾過により分離し、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>で2回洗浄した。濾液を濃縮しクロマトグラフにかけた(フラッシュシリカ、1:9:9.0~2:1.6:8.0の酢酸:メタノール:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>勾配液)。カラム分画をTLC(シリカ、1:9:9.0の酢酸:メタノール:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)で分析し、中間で溶出するピンク色の帯を含む最も純粋な分画を集めた。NMR分析で幾つかの分画にGABAによる汚染の可能性が示されたのでこれらをCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>中の懸濁液から再度濾過し、全部でSRB-GABA 8.9 mgが得られた。収率11%はたぶん濾過工程における生成物の損失のためであろう。

## 【0018】生成物の分析

<sup>1</sup>H NMR (4:1 CDCl<sub>3</sub> - CD<sub>3</sub>OD) δ 1.33 (t, 12H)、1.73 (t, 2H)、2.28 (t, 2H)、2.93 (t, 2H)、3.62 (q, 8H)、6.70-7.35 (スルホローダミンH' S)、8.29 (d, 1H)、8.65 (s, 1H)。

【0019】<sup>13</sup>C NMR (4:1 CDCl<sub>3</sub> - CD<sub>3</sub>OD) δ 12.2, 24.7, 30.8, 42.2, 45.8, 95.8, 114.0, 126.0, 129.6, 130.7, 131.4, 131.9, 140.6, 155.6, 156.0, 157.6。

## 【0020】HPLC 保持時間 11.4分

高分解能 FAB+MS [MH<sup>+</sup>] : C<sub>21</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub>

計算値 644.2100 実測値 644.2076

## 実施例2 SRB-GABAのpH反応

実施例1で合成されたSRB-GABAは、スルホローダミンからのその誘導化のためにpHに対し蛍光的に安定であることが最初は予想された。しかしながら、この化合物のpH対UV/可視光スペクトルの分析により、SRBに存在しなかったいくつかのpH依存性挙動が示された。実施例1で合成されたSRB-GABAのpH対蛍光強度特性を測定するために、化合物を1.0 mMリン酸塩緩衝液、pH 8.0中に溶かした。これを綿に通して濾過し散乱を減らし、pHを必要に応じて希(約50

特開平6-207112

12

0.1N)水酸化ナトリウムと塩酸溶液で調節した。

【0021】バーキンエルマー(Perkin Elmer) LS-5 蛍光光度計を次のようにセットした:

スリット: 励起=5 ; 発光=3

スピード: 120 nm/分

励起: 544 nm

発光: 500~700 nm

驚くべきことに、SRB-GABA化合物(化合物I)は、pHの変化に対応して蛍光強度が変化し、そしてpHがより酸性になるにしたがって蛍光強度が増えることを示した。結果を表Iに示す。

## 【0022】

## 【表1】

表 I

pH	蛍光強度
11.30	63
10.15	64
9.35	103
8.90	147
8.40	193
8.00	253
7.75	260
7.40	270

上記結果を図1にグラフで示す。SRB-GABAは約8~9.5のpH範囲で最大のpH対蛍光強度変化を示し、pH 7.4~10.15の蛍光強度においてほぼ4倍に変化する。この研究の結果を図1にグラフで示す。

## 【0023】実施例3 SRB-GABA-ADAの合成

SRB-GABA NHSエステルを、ボダンスキイー アンド ボダンスキイー(Bodansky and Bodansky)、“ザ プラクティスオブ ベブチド シンセシス(The Practice of Peptide Synthesis)”, 1984, p125に記載されたものとほぼ同じに調製した。SRB-GABA (140 mg, 0.218ミリモル)およびN-ヒドロキシーサクシニミド(30 mg, 0.26ミリモル)を、無水CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 5 ml含有丸底フラスコへ加えた。攪拌混合物をアルゴン下に冰浴中で冷却した。ジシクロヘキシカルボジイミド(DCC, 54 mg, 0.26ミリモル)を加え、混合物をアルゴン下に周囲温度にて1.8時間攪拌した。得られた混合物を粗ガラスフリットに通して濾過し、固体をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>で2回リーンスした。集めた濾液から溶媒を除去し、分画を洗浄し、残渣をクロマトグラフィにかけた(フラッシュシリカ、1:9のメタノール:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)。所望のNHSエステルは少量の未反応SRB-GABAのちょうど前において溶出した。溶媒を減圧下に除去すると、SRB-GABA NHSエステル 138 mg (85%)がピンク/紫色の“ガラス”として得られた。

(8)

13

【0024】生成物分析:  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3 / \text{CD}_3\text{OD}$ ) w 1. 28 (t, 1.2 H), 1. 85 (t, 2 H), 2. 63 (t, 2 H), 2. 71 (br s, 1 H), 2. 97 (t, 2 H), 3. 30 (br s, 4 H, サクシニミド- $(\text{CH}_2)_2$ -), -), 3. 65 (q, 8 H), 6. 70-7. 18 (m, 7 H), 8. 23-8. 55 (m, 2 H); FAB+MS: m/z 741 ( $\text{MH}^+$ ), 713 ( $\text{M}^+ - \text{Et}$ ), 626 ( $\text{M}^+ - \text{NHS}$ )

高分解能 FAB+MS [ $\text{MH}^+$ ]:  $\text{C}_{35}\text{H}_{41}\text{N}_4\text{S}$  10  
:  $\text{O}_{10}$

計算値 741. 2264 実測値 741. 2  
260

SRB-GABA NHSエステル (138 mg, 0. 186 ミリモル) および 12-アミノードデカン酸 (ADA-アルドリッヒ, 60 mg, 0. 28 ミリモル) を、5 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  含有丸底フラスコへ加え、混合物を周囲温度にてアルゴン下に 72 時間攪拌した。TLC 分析 (シリカ、10%メタノール- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) によれば、未反応 NHSエステル ( $R_f = 0. 35$ ) とともに新規生成物 ( $R_f = 0. 28$ ) が示された。さらに ADA または DMAP を添加しても反応が完了したことは観察されなかった。溶媒蒸発に続いてフラッシュクロマトグラフィ (シリカ、7%~12% メタノール- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  の勾配溶液) を行なうと NHSエステル 24 mg と、ピンク/紫色の“ガラス”として完全に純粋な SRB-GABA-ADA 64 mg (41%) が得

特開平6-207112

14

られた。これを同じ条件下に再度クロマトグラフィにかけると分析のための純粋な物質が得られた。

【0025】生成物分析:  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3 / \text{CD}_3\text{OD}$ ) w 1. 25 (br s, 1.6 H), 1. 28 (t, 1.2 H), 1. 58 (t, 2 H), 1. 65 (t, 2 H), 2. 20 (t, 2 H), 2. 28 (t, 2 H), 2. 95 (t, 2 H), 3. 08 (t, 2 H), 3. 65 (q, 8 H), 6. 70-7. 18 (m, 7 H), 8. 23-8. 55 (m, 2 H)

HPLC 保持時間 26. 5 分

高分解能 FAB+MS [ $\text{MH}^+$ ]:  $\text{C}_{43}\text{H}_{51}\text{N}_4\text{S}$   
:  $\text{O}_9$

計算値 841. 3880, 実測値 841.  
3869

#### 実施例4 SRB-GABA-ADAのpH反応

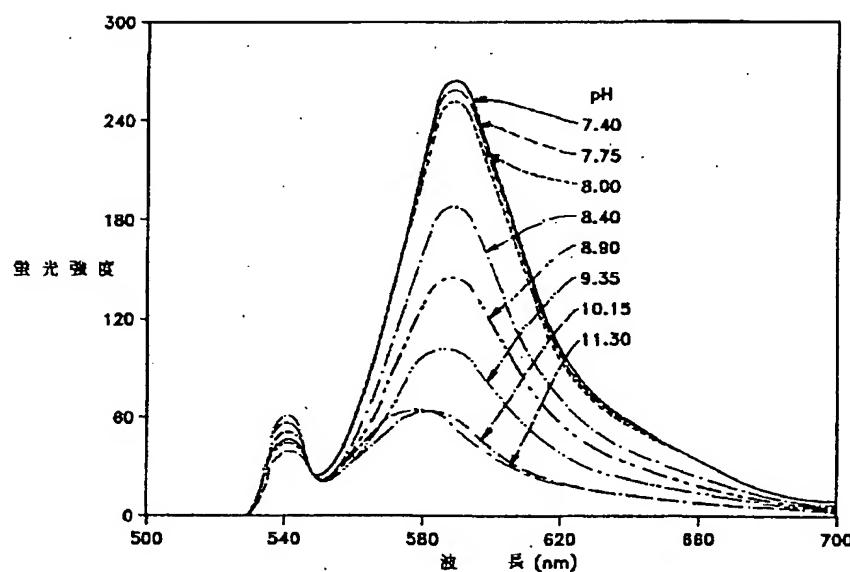
実施例3で合成された SRB-GABA-ADA 化合物の pH 反応特性を、SRB-GABA に対し実施例2で記載したのとほぼ同じように評価した。蛍光強度を pH 11. 2, 9. 5, 8. 9 および 8. 1 で測定し、結果を図2にグラフで示した。ここでも蛍光強度における最大の変化が約 pH 8 ~ pH 9. 5 の間で見られ、pH 8. 1 ~ 11. 2 の蛍光強度で約 6 倍の変化であった。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、化合物I (SRB-GABA) のpH 依存性蛍光反応を示すグラフである。

【図2】図2は、化合物II (SRB-GABA-ADA) のpH 依存性蛍光反応を示すグラフである。

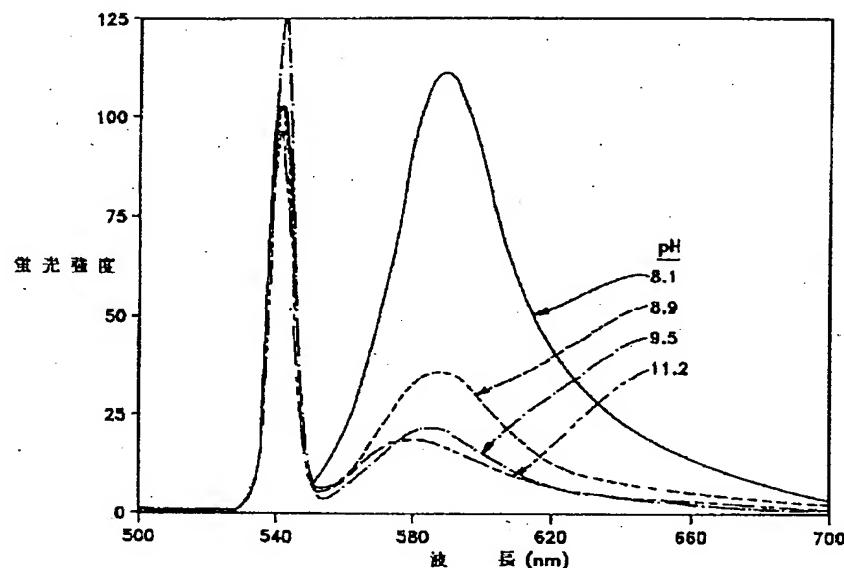
【図1】



(9)

特開平6-207112

【図2】



フロントページの続き

(72)発明者 ランダル・エイ・ホーク  
アメリカ合衆国ノース・カロライナ州  
27513, ケアリー, スティール・トラッ  
プ・コート 107